

INFORME DA ACTUACIÓN CIAM/12/2016

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DO PEMENTO AMPARADO POLA DOP PEMENTO DE HERBÓN”

SUBMEDIDA M10.2.2 DE APOIO Á CONSERVACIÓN, USO E DESENVOLVEMENTO SOSTIBLE DOS RECURSOS XENÉTICOS NA AGRICULTURA

INFORME DE RESULTADOS

INTRODUCCIÓN

O pemento (*Capsicum* spp.) é un dos cultivos hortícolas máis importantes. É cultivado en todo o mundo, principalmente nos países tropicais e subtropicais. O pemento é un complexo de especies orixinario da zoa intertropical de América. O xénero *Capsicum* pertence a familia das Solanaceae e inclúe 27 especies recoñecidas. A estrutura taxonómica do xénero foi establecida de xeito multidisciplinar usando taxonomía numérica, datos citoxenéticos, bioquímicos, xeográficos e etnobotánicos. Datos que evidenciaron 5 diferentes especies cultivadas: *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L., e *C. pubescens* Ruiz et Pav., os cales se orixinaron a partir de diferentes eventos de domesticación en centros de diversificación primaria, onde as especies salvaxes seguen a existir. Os pementos foron introducidos en Europa polo final do século XV, sendo a especie máis exitosa nos países europeos o *C. annuum*. Dende estes centros de diversificación secundaria, as diferentes especies foron seleccionadas polos agricultores durante décadas de cultivo dependendo dos diferentes ambientes agroclimáticos de cada rexión, dando lugar a liñas locais ou ecotipos e resultando nunha gran diversidade fenotípica dos cultivares de pemento de hoxe en día.

A conservación de ecotipos e variedades locais é crucial, xa que os cultivares altamente mellorados e modernos estanos a remprazar, o cal é unha ameaza que provoca erosión xenética. Para a maioría das especies cultivadas, a perda de variabilidade xenética comeza tan pronto como comeza o proceso de domesticación. Os miles de ecotipos e variedades locais orixinados pola selección dos agricultores representan unha gran fonte de diversidade, particularmente para alelos de interese agrícola e adaptacións locais, como por exemplo caracteres de calidade, tolerancia ou resistencia a estreses bióticos e abióticos. En España pódese atopar unha gran variedade de rexións agro-climáticas e polo tanto, heteroxeneidade dos ecotipos e liñas locais adaptadas e moi diversas fenotípicamente.

A historia do cultivo do pemento pérdese nos albores do século XVII, onde os monxes do convento de Santo Antonio da parroquia de Herbón, concello de Padrón, comezaron a cultivar un chile procedente do actual México. Esta práctica serviu para que o pemento (en forma de pementa, picante, seca e moída) fose recoñecida no Catastro do Marqués de la Ensenada, detallado nos transportes de especia desde Pontecesures. Non se sabe moi ben en que momento o comercio da especia, seca e moída foi trocado polo seu consumo en fresco, pero a dicir das persoas de máis idade da parroquia de Herbón, lembran que xa os seus avós comercializaban pemento verde para o seu consumo no mercado de Abastos de Santiago a primeiros do século XX.

A Denominación de Orixe Protexida Pemento de Herbón nace no ano 2009 pola orde da Consellaría do Medio Rural da Xunta de Galicia: *Orde do 1 de xullo de 2009 pola que se aproba o Regulamento da denominación de orixe protexida Pemento de Herbón e do seu Consello Regulador e se nomea o Consello Regulador Provisional* (DOG 10 de xullo de 2009). Esta Denominación de Orixe nace ao abeiro das sucesivas demantas das persoas que durante séculos veñen traballando nas hortas das comarcas do río Sar e nas beiras do Ulla que rematan na ría de Arousa. A denominación acolle unha variedade local ou tamén ecotipos propios da variedade comercialmente recoñecida de pemento chamada “Padrón”. A denominación recolle os anseios de demarcar un produto de certa exclusividade que ten acadado certa sona a nivel estatal e tamén internacional e que, debido a esta, tense incorporado á cociña pero tamén ás hortas de moitas zonas peninsulares. O pemento do tipo padrón que tanto se cultiva e se comercializa en moitas zonas foi rexistrado en 1984 e polo tanto, enténdese que o cultivado na comarca que abarca a Denominación é un conxunto de ecotipos locais.

O cultivo do pemento de Herbón acada os concellos de Rois, Padrón e Dodro, nas beiras do Sar, na provincia de A Coruña e os concellos de Valga e Pontecesures, na provincia de Pontevedra. A superficie total cultivada rolda as 6,5 hectáreas nas que aproximadamente o 65% se cultiva baixo plástico e o 35% restante é cultivo ao aire libre. A Denominación de Orixe está constituída por 29 produtoras/es. A plantación da semente realízase a primeiros de novembro e o transplante a invernadoiro realízase a mediados de febreiro. O transplante ao aire libre ponse en marcha a primeiros de maio. A colleita comeza a partires da terceira semana de maio e remata o 31 de outubro do mesmo ano.

Os microsátélites (SSRs) son secuencias de ADN que consisten en cortas repeticións en tandem de entre 1 a 6 nucleótidos que frecuentemente exhiben polimorfismo entre xenotipos cercanos. Son marcadores codominantes e poden ser analizados por técnicas de alto rendemento baseadas na PCR (Reacción en Cadea da Polimerasa). Os microsátélites son una ferramenta ideal para tarefas de tipos de pegada xenética e identificación xenotípica así como para a construción de mapas xenéticos e para a mellora asistida por marcadores (MAS).

No caso do pemento, a pesares de ter un xenoma relativamente grande (3.7-4.7Gb), exhibe un baixo nivel de polimorfismo. Durante a última década son múltiples os traballos que se levaron a cabo co fin de obter diferentes mapas xenéticos do pemento, acadándose no ano 2014 a secuenciación total do xenoma do pemento da especie *C. annuum* cv CM334.

OBXECTIVOS

Os obxectivos da presente actuación foron os seguintes.

- Coñecer en profundidade e a nivel bioquímico os ecotipos locais da variedade de pemento de Herbón.
- Caracterización xenética e molecular dos ecotipos locais.
- Diferenciar os ecotipos locais de pemento fronte a variedades externas.

Para acadar estos obxectivos, no ano 2016 desenvolvéronse as seguintes actividades:

- Continuación do programa de caracterización molecular iniciado no ano 2015 (CIAM/02/2015), mediante a proposta de estudo molecular do pemento de Herbón e comparación con outras variedades da mesma especie para a súa diferenciación no mercado e a nivel técnico.

- Caracterización das explotacións mediante identificación das parcelas actúantes para coñecer os cultivares e as diferentes castes. O pemento de Herbón é unha caste autóctona que, en realidade, consta de ecotipos diferentes segundo cada explotación, por ter sido unha característica histórica do seu cultivo.
- Establecemento de grupos de cultivo, cultivares que teñan grupos semellantes ou variedades procedentes da mesma orixe.
- Recollida de mostras nas explotacións que compoñen a D.O.P Pemento de Herbón.

METODOLOXÍA

Material vexetal

O material de estudio relaciónase na Táboa 1. Estas mostras foron recollidas polo Técnico das explotacións, o Enxeñeiro Óscar Antón Pérez García, quen coordina o traballo na SAT “A Pementeira”, e noutras explotacións da DOP “Pemento de Herbón”.

Táboa 1. Mostras de pemento recollidas nos invernadoiros da zona produtora.

Número	Data	Explotacion
1	17/08/16	Carmen Dios
2	17/08/16	Milagros Glez
3	17/08/16	Rosa Guimarey
4	17/08/16	Lucía Dieguez
5	22/08/16	Alicia Ramallo
6	22/08/16	Milagros Piñeiro
7	22/08/16	Rosa M ^a Dieguez
8	22/08/16	M ^a Carmen Rarís
9	22/08/16	Teresa Pérez
10	22/08/16	Peregrina Dios
11	23/08/16	Begoña Chenlo
12	23/08/16	Rosa Perez
13	23/08/16	M ^a Carmen Pérez
14	23/08/16	M ^a Luísa Vazquez
15	23/08/16	Pilar Boga
16	23/08/16	J.Ramon Magariños
17	24/08/16	Raquel Rarís
18	24/08/16	Teresa Garcia
19	24/08/16	Ramón Torrente
20	24/08/16	Teresa Mariño
21	24/08/16	Lucia Conde
22	25/08/16	Evangelina Martinez
23	05/09/16	Alejandro Ferro

Recolléronse un total de 5 mostras por invernadoiro, agás no invernadoiro 12, ó sospeitar a presenza de dous ecotipos, onde se recolleron 10 mostras. Ademais de estas mostras, incluíronse no estudo outras liñas de pemento de Padrón conservadas no CIAM, así como tamen de pemento Celta, Entenza e Couto.

Extracción do ADN e cuantificación

Realizáronse un total de 120 extraccións de follas frescas. A extracción fíxose seguindo o método de CTAB de Lefort e Douglas (1999) modificado.

A extracción realizase homoxeneizando as mostras cun buffer de extracción, e seguindo con unha serie de pasos e protocolos que levan aparellado o illamento, a precipitación e o lavado de ADN utilizando diferentes buffers e solucións. (Figura 1)

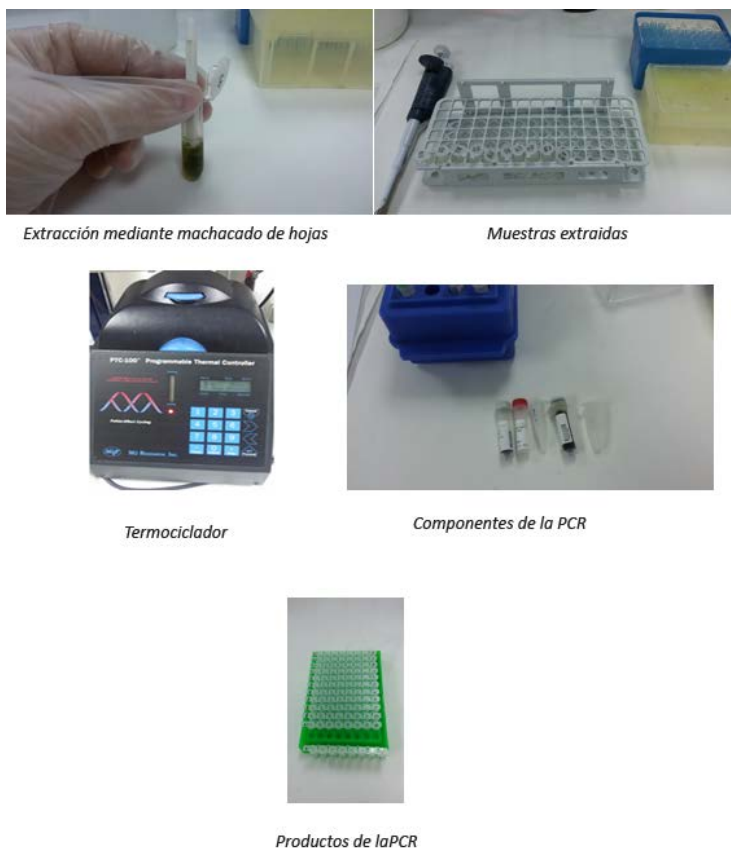


Figura 1. Extracción, amplificación e PCR de mostras

Obtida a extracción, lévase a cabo a cuantificación da mesma, para coñecer a concentración de ADN e a calidade do mesmo, co fin de uniformizar concentracións para posteriores traballos. Esta cuantificación faise utilizando un Nanodrop (que é un espectrofotómetro que mide a absorbancia a determinadas lonxitudes de onda). Unha vez determinada a concentración de cada mostra, fanse alícuotas das mesmas co fin de levalas todas á mesma concentración de traballo (aprox. 50 ng/ul).

Amplificacións

Unha vez se tiveron as mostras á mesma concentración de traballo, procedeuse a amplificación das mesmas, mediante a técnica PCR (Polimerase Chain Reaction) co fin de obter moitas copias de un fragmento de ADN molde. Con este fin preparouse unha mezcla que contén: ADN molde, Taq polimerasa (que é unha enzima necesaria para a xeración da nova copia de ADN), dNTPS (nucleótidos fosfatados necesarios pra formar as novas

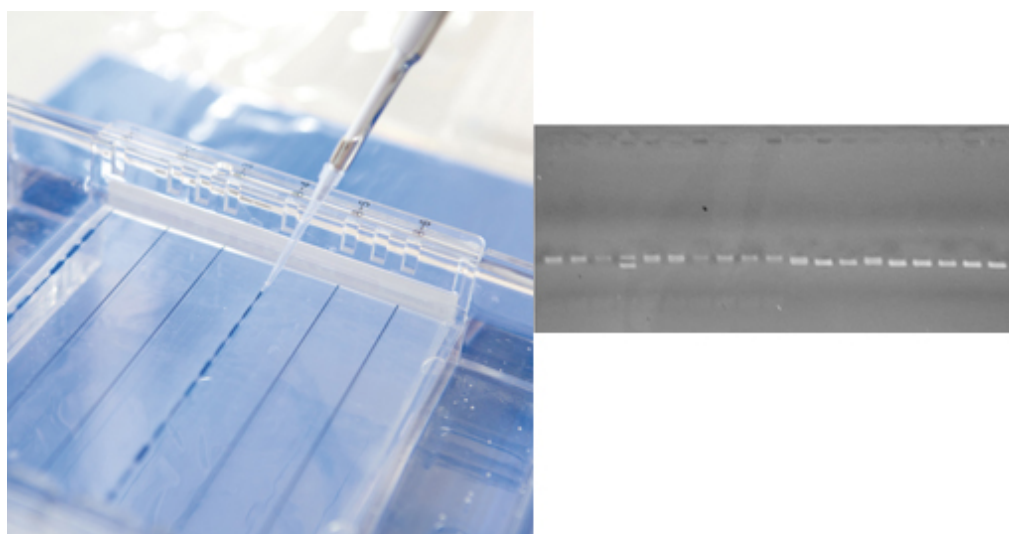
cadeas de ADN), os primers Forward e Reverse (un deles marcado cun fluorocromo co fin de que poida ser detectado no amplificador) e outros produtos necesarios para a catalización da reacción, como o MgCl₂.

Cando se tivo a mezcla de PCR, introdúxose nun termociclador (Figura 1), que o que fai é repetir diversos ciclos de subida e baixada da temperatura co fin de completar os diferentes ciclos necesarios para completar a PCR o crear as copias de ADN. Neste termociclador ocorren diferentes procesos: activación da Taq polimersa para iniciar o proceso, desnaturalización, annealing, e extensión da cadena.

Secuenciación

Os produtos da PCR corréronse nun xel de agarosa co fin de visualizar se a reacción foi correcta (Figura 2).

Posteriormente preparáronse as mostras para introducilas nun secuenciador ABI PRISM 3730, onde se detectaran as variación de tamaño nas mostras. Para iso foi necesario preparalas previamente engadindo 15 µL formamide + 0.4 µL GeneScan™-500 ROX e desnaturalizando a 95°C durante 5 min.



Visualización dos produtos da PCR en gel de agarosa

Figura 2. Visualización dos produtos de PCR en xel de Agarosa

Lectura e interpretación de resultados

As mostras introducíronse nun secuenciador ABI 3730, que mediante un láser é capaz de detectar os fluorocromos que levan incorporados os SSRs. A partir das lecturas de precisión feitas polo analizador de fragmentos, a interpretación dos resultados realizouse co programa Peak Scanner v.1.0 (AB, 2009) a partir dos picos detectados (Figura 3).

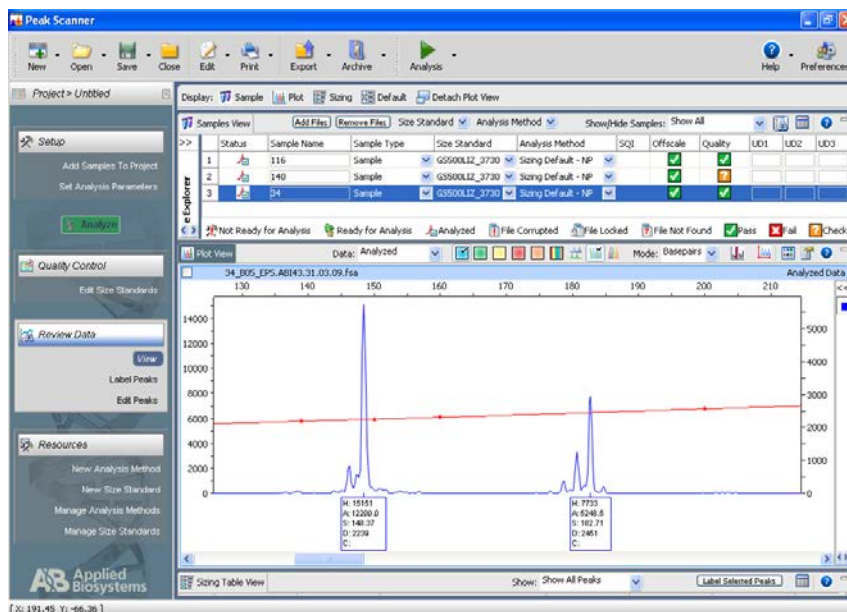


Figura 3. Interpretación das lecturas obtidas polo analizador de fragmentos ABI 3730 no programa Peak Scanner v.1.0 en función do locus y tamaño alélico.

Revisión e comparación cos resultados previos

Obtidas as lecturas, introducíronse nunha base de datos, onde se realizou o axuste dos alelos dos mesmos, para permitir a identificación xenética, e a comparación con resultados previos co fin de detectar posibles sinonimias.

RESULTADOS

1.- **Extraccións e cuantificacións** de ADN dos invernadoiros finalizadas. En unhas semanas, incluíranse as liñas complementarias de pemento de Padrón que se están a cultivar no CIAM. En total, e ata o momento, foi extraído e posteriormente cuantificado, o ADN de 120 mostras.

2.- **Posta a punto da técnica** finalizada. Amplificacións en proceso de realización para a maior parte das mostras e para unha selección inicial de 5SSRs, os máis polimórficos segundo a literatura, co fin de detectar posibles variacións dentro dos invernadoiros, e no caso de que non se detecte variación, proceder a unha nova selección de mostras.

3.- **Fase de lanzamento** da primeira placa, coa totalidade das mostras.

4.- **Análise de datos.** Procedeuse a reanalizar os datos anteriores dispoñibles.. Fíxose unha relectura dos alelos atopados nos traballos previos, atopando unha coherencia importante cos resultados expostos. Unha decisión tomada despois desa revisión, foi a de incluír un maior número de referencias do pemento de Padrón para ter confirmación das diferencias atopadas previamente co pemento de Herbón. E dicir, comprobar que non exista variabilidade entre as liñas de Padrón conservadas no CIAM.

Mabegondo, 31 de outubro de 2016

O Investigador

O Director do CIAM

Alfredo Taboada Arias

Manuel López Luaces